

## 脂質ラジカルの電子スピン共鳴吸収法による研究

著者	千葉 俊之
号	308
発行年	1982
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/16798">http://hdl.handle.net/10097/16798</a>

氏 名（本籍）	ち ば とし ゆき 千 葉 俊 之
学 位 の 種 類	農 学 博 士
学 位 記 番 号	農 博 第 3 0 8 号
学位授与年月日	昭和 5 8 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 （博士課程）食糧化学専攻
学 位 論 文 題 目	脂質ラジカルの電子スピン共鳴吸収法による研究

論文審査委員（主 査）

教授 金 田 尚 志	教授 目 黒 熙
	教授 池 上 雄 作

## 緒 言

脂質の酸化は、フリーラジカル連鎖反応で進行するとされ、数多くの研究がおこなわれてきた。しかし、反応中間体のラジカルに注目した研究は少ない。これは、反応に関与するラジカルが短寿命で反応性が高く定常状態濃度が極めて低いため、ラジカルを特異的に高感度に検出できる電子スピコ共鳴 (ESR) によっても検出が非常に困難なためである。したがって、これらのラジカルに関しては不明な点が多い。

近年、短寿命ラジカルの新しい研究方法としてスピントラップ法が開発されつつある。そこで本研究では、脂質由来ラジカルの研究に本法を取り入れ、従来のESRによる直接観測法と共に反応中間体のラジカルに関する研究を行った。さらに、生体組織の老化や脂質の過酸化反応にもフリーラジカルや活性酸素種などが関与しているとされているので、その

点についてもスピントラップ法を用いて検討を行った。

## 第1章 液体窒素温度における脂質ラジカルの検出

リノール酸メチル (ML) を空气中で自動酸化させ経時的に液体窒素温度において ESR スペクトルを測定したが、POV が 240 meq/kg に到ってもシグナルは検出されず、より高度不飽和酸であるリノレン酸メチル、ドコサヘキサエン酸メチルにおいても同様な結果が得られた。つまり、自動酸化では連鎖反応の *carrier* であるペルオキシラジカルでさえも、ESR により検出することが不可能なことが確認された。そこで、脂肪酸より生成するラジカルを検出するため、液体窒素温度で ML、ドコサヘキサエン酸メチルに光を照射した。その結果、Fig.1 に示すブロードなシグナルが検出されたが、分裂パターンをもたないため

ラジカルの構造に関しては不明であった。

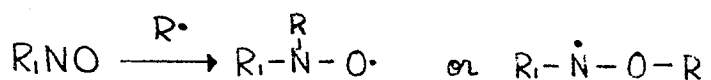
## 第2章 脂質より生成するラジカルのスピントラップ法による検出

脂質ラジカルは、極低温においても検出することが困難なため、新しい短寿命ラジカル研究法であるスピントラップ法により実験を行った。

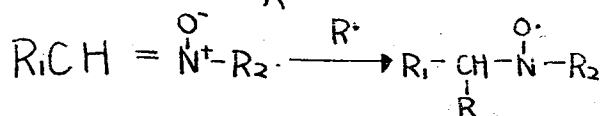
### 2-1 スピントラップ法

スピントラップ法とは、短寿命ラジカルをスピントラップ剤に捕捉させ安定化させた後に、捕捉短寿命ラジカルの情報をESRスペクトルより得る方法である。スピントラップ剤としては、大別してニトロソ化合物とニトロン類に分けられ、短寿命ラジカルに対する反応は、下式で表わされる。

#### (1) ニトロソ化合物



## (2) ニトロコノ類



そして、捕捉ラジカルの種類・反応系の溶媒・ESRスペクトルの単純さ・光照射・温度などの実験条件より適当なスピントラップ剤を選択する必要がある。

### 2-2 自動酸化リノール酸メチルより光照射時に生成するラジカルのDNDによる捕捉

スピントラップ剤として重水素置換ニトロリデュシン(DND)を用いて、自動酸化MLから生成するラジカルの捕捉を試みたが、混合しただけではラジカルが検出されなかった。しかし、光照射によりシグナル(Fig.2)が検出され、このシグナルの分裂パターン・結合定数などより捕捉されたラジカルは、ML由来の第2級アルキルラジカル( $-\dot{C}H-$ )と推定された。このラジカルは、短波長の光ほど生成しやすく(Fig.3)、400nmより長波長光で

は殆んど生成せず、自動酸化 ML よりラジカルを生成させるためには、400nm より短波長光が必要なことを認めた。光照射時に生成するラジカルは、酸化時間が長くなるほど生成量が多く、ML の POV と比例関係が認められた (Fig. 4)。さらに、リノール酸メチルヒドロペルオキシドを ML に添加した場合、ラジカル生成量がヒドロペルオキシド添加量と比例関係 (Fig. 5) にあった。従って、自動酸化 ML に光照射した場合、ヒドロペルオキシドの光分解が主原因となり第2級アルキルラジカルが生成することが判明した。

### 2-3 各種脂肪酸メチルより生成するアルキルラジカルのDNDによる捕捉

リノール酸メチルより二重結合が多いリノレン酸メチル、ドコサヘキサエノ酸メチルでは、光照射によりリノール酸メチル (Fig. 2) と等しい ESR スペクトルが観測された。従って、リノール酸メチル型の二重結合配列を持つジエン酸以上のポリエン酸メチルでは、同

一のラジカル中心構造 ( $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\dot{\text{C}}\text{H}-\text{CH}_2-$ ) を持つ第2級アルキルラジカルが生成すると推測された。しかし、モノエン酸メチル ( $\text{C}_{13:1}$ )、飽和酸メチル ( $\text{C}_{16:0}$ ,  $\text{C}_{18:0}$ ) のスペクトル (Fig. 6) は、リノール酸メチルと異なっており、観測されたスペクトルの分裂パターン・結合定数から生成するラジカルは、第1級アルキルラジカルと第2級アルキルラジカルと推定された。さらに、この第1級アルキルラジカルはどの脂肪酸メチルでもラジカル中心構造が等しく、脂肪酸とエステル結合しているメタノール由来のメチル基より生成したラジカルと考えられた。

#### 2-4 各種脂肪酸メチルの自動酸化時に生成するラジカルの Phenyl N-t-butyl nitron による捕捉

DND により光照射時に生成するアルキルラジカルを確認することができたが、脂質の酸化では他のラジカル ( $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$  etc) の生成も推測されている。そこで、自動酸化時に生



成するラジカルの捕捉を試みた。スピントラップ剤としては、自動酸化で主に生成すると考えられる酸素ラジカルの捕捉に適した Phenyl N-t-butyl nitron (PBN) を用いた。その結果、Fig 7 に示すスピニアダクトスペクトルが観測され、シグナル強度は時間の経過と共に増加し、不飽和酸ほどシグナル強度増加率が大きかった (Fig 8)。また、ここで捕捉されたラジカルは、ペルオキシラジカルと推定された。

### 第3章 各種脂肪酸メチルのアルキルラジカルとペルオキシラジカルのESRスペクトル

これまでは、スピントラップ法によりアルキルラジカルの構造の推定あるいは、ペルオキシラジカルの存在の確認をしてきたが、ラジカル開始剤 ( $\text{Bu}^\bullet\text{OOBu}^\bullet$ ) を用いてうまく実験条件を設定することにより、脂肪酸メチルエステルより生成するアルキルラジカルとペル

オキシラジカルを検出することができたので、さらに詳細なラジカル構造の検討を行った。

### 3-1 アルキルラジカルのESRスペクトル

Fig. 9に示すように、リノール酸メチル、リノレニ酸メチルより同一のESRスペクトルが得られ、リノエライジン酸メチル(9-t, 12-t C<sub>18:2</sub>)からはリノール酸メチルと異なるスペクトルが得られた。スペクトルの解析から、それぞれの脂肪酸メチルエステルのアルキルラジカルは、リノール酸メチル、リノレニ酸メチルでFig. 10-aのペンタジエニルラジカルが、リノエライジン酸メチルでは、Fig. 10-bのペンタジエニルラジカルが生成したと推定された。さらに、エライジン酸メチルのスペクトルよりFig. 10-cのアリルラジカルが予想された。オレイン酸メチルでは、Fig. 10-dのアリルラジカルと推測されるが、エライジン酸メチルとほぼ同一のスペクトルが得られることから、オレイン酸メチルのアリルラジカルは、すみやか

に異性化反応によりFig.10-Cのアリルラジカルに変換することが推定された。

### 3-2 ペルオキシラジカルのESRスペクトル

脂肪酸メチルのペルオキシラジカルのシグナル (Fig.11) は、分裂パターンがdoublet (結合定数、4.4~5.1 G) で、 $g$ -値が2.016であった。しかし、飽和酸メチル ( $C_{18:0}$ ) からは同条件下でペルオキシラジカルは検出されず、アルキルラジカルが検出された (Fig.12)。このアルキルラジカルは、分裂パターンから  $RCH_2\dot{C}HCOOCH_3$  と推定された。

## 第4章 生体組織で生成するラジカルとスピントラップ法

過酸化脂質や四塩化炭素などを投与したラットでは、組織中の脂質過酸化が進行することが知られており、この生体内過酸化反応にも、フリーラジカルが関与すると推測されて

いる。又、老化のメカニズムのひとつとしてフリーラジカル説が唱えられており、生体組織で生成するラジカル研究においても、スピントラップ法の有効性が期待される。

5-1 ラット肝ホモジネートあるいはミクロソームに過酸化脂質を添加した時に生成するラジカルの捕捉

生体内過酸化反応の *in vitro* でのモデル系として、ラット肝ホモジネート、ミクロソームに過酸化脂質（自動酸化リノール酸メチル、リノール酸メチルヒドロペルオキシド）を添加し、生成してくるラジカルをスピントラップ剤（PBN）を用いて捕捉した。その結果、肝ホモジネートにおいて Fig. 13 に示す ESR スペクトルが観測され、捕捉されたラジカルは、アルコキシラジカルと推定された。このラジカルは、過酸化脂質の添加につれて増加 (Fig. 14) した。ラット肝ミクロソームの場合も同様な結果が得られ、ヒドロペルオキシドが細胞内成分（ヘモグロビン、チトクローム *etc*）によ

に分解され、生成したアルコキシラジカルが過酸化反応の連鎖のキャリアーのひとつとなるものと推定された。

## 5-2 老化とフリーラジカル

老化のメカニズムのひとつとしてフリーラジカル説が唱えられ、特に $\cdot OH$ が重要であるとする考えも提出されている。そこで、2ヶ月令と18ヶ月令のラットより肝ミクロソームを調製し、NADPH 依存脂質過酸化の際に生成する $\cdot OH$ を5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO)で捕捉し生成量の比較と、5-1と同様に、リノール酸ヒドロペルオキシドを添加した時のラジカル生成量の比較を行った。その結果 (Fig. 15.16) 2ヶ月令において細胞内成分の活性が高いためか、ラジカル生成量が大きかったが、その生成ラジカルの消去能力が大きいため、ある一定時間インキュベートした後では、明らかに18ヶ月令ラットミクロソームの方がラジカル量が大きかった。つまり、若ラットの方がラジカルに対する防御機構活性が大きいこと

が示唆された。この推論を指示する結果がラット肝ホモジネートの凍結乾燥試料のラジカル量比較からも得られた (Fig. 17)。

## 第5章 総 括

本研究により脂質より生成するアルキルラジカル、ペルオキシラジカル、アルコキシラジカル (Fig. 18) が確認された。又、脂質ラジカル研究におけるスピントラップ法の有用性も確認された。生体内過酸化反応において、脂質過酸化物由来のラジカルを確認した。

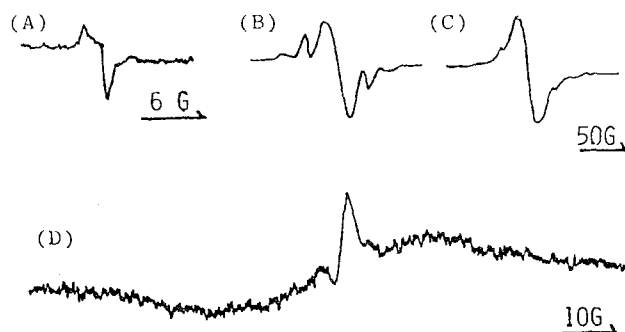


Fig.1 ESR spectra of radical species generated by the irradiation of (A) methyl linoleate, (B) cocoabutter\*, (C) linseed oil\*, and (D) methyl docosahexaenoate with UV light at  $-196^{\circ}\text{C}$ .  
\*Deffner, C.U., Lück, H. and Kohn, R : Z. Lebensm. Untersuch. Forsch., 125, 281, 1964

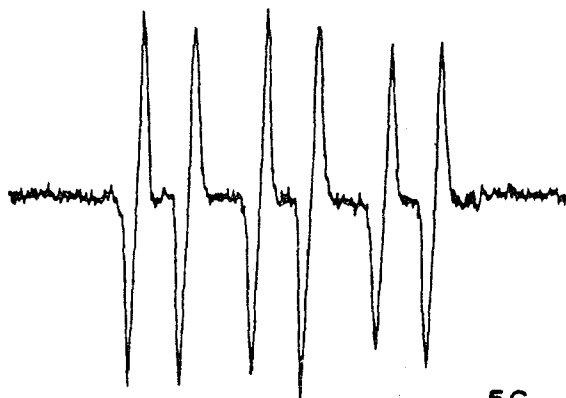


FIG. 2 ESR spectrum of the spin adduct generated from the secondary alkyl radical and DND. Hyperfine splitting constants:  $a_N = 13.8 \text{ G}$ ,  $a_H = 6.0 \text{ G}$ .

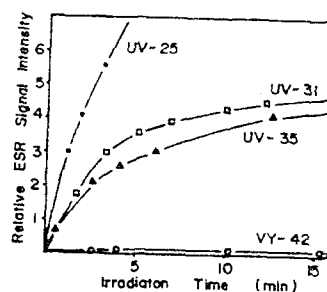


FIG.3 Change of ESR signal intensity of spin adducts with the time of irradiation using 4 filters, VY-42, UV-35, UV-31 and UV-25.

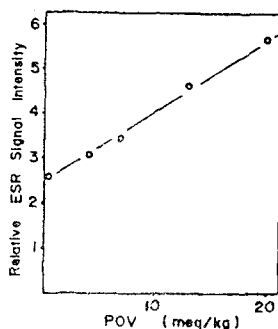


FIG.4 Relationship between POV and signal intensity after 5 min irradiation.

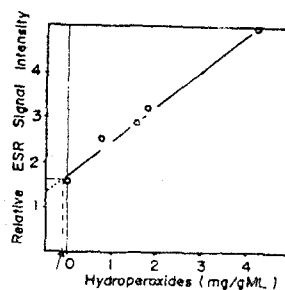


FIG.5 Relationship between ESR signal intensity and amounts of added hydroperoxides to ML. ESR signal was measured after irradiation with the light longer than 250 nm for 5 min. Arrow shows position of zero POV.

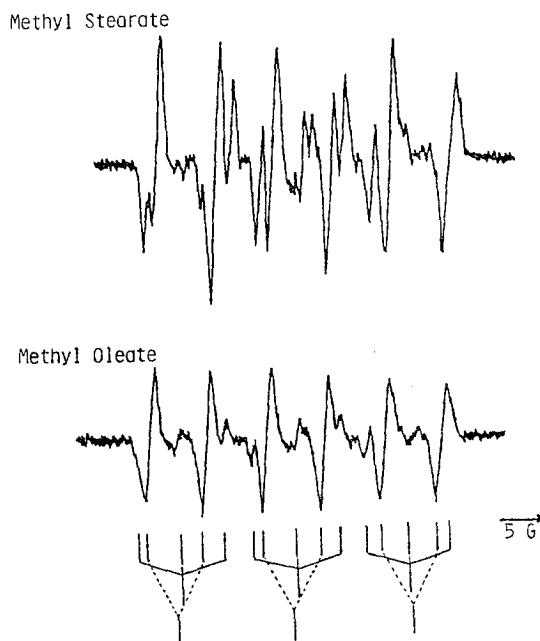


Fig. 6 Hyperfine Structure of ESR Spectrum Obtained from the Spin Adducts Generated from Several Methyl Esters and DND.



Fig. 7 ESR spectrum of spin adducts observed in autoxidation of methyl linoleate containing PBN.

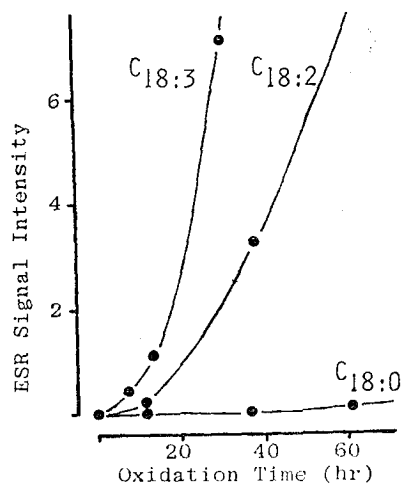


Fig. 8 Change of ESR signal intensity of spin adducts with oxidation time. Methyl esters were oxidized at 30°C in the presence of PBN ( $2.4 \times 10^{-4} M$ ).



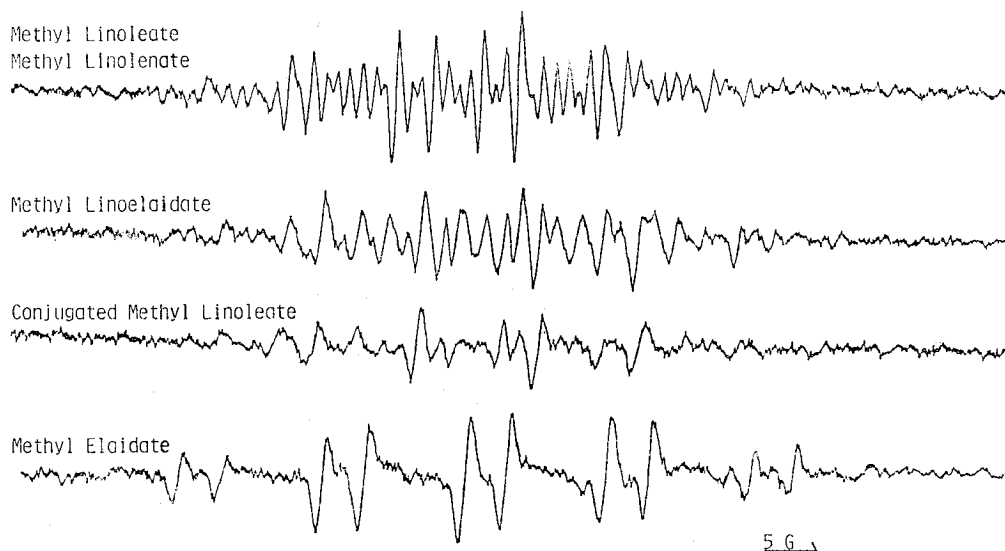


Fig. 9 ESR Spectra of Alkyl Radicals Obtained on Hydrogen Abstraction from Several Methyl Esters by  $\text{Bu}^t\text{O}^\cdot$  Radicals.

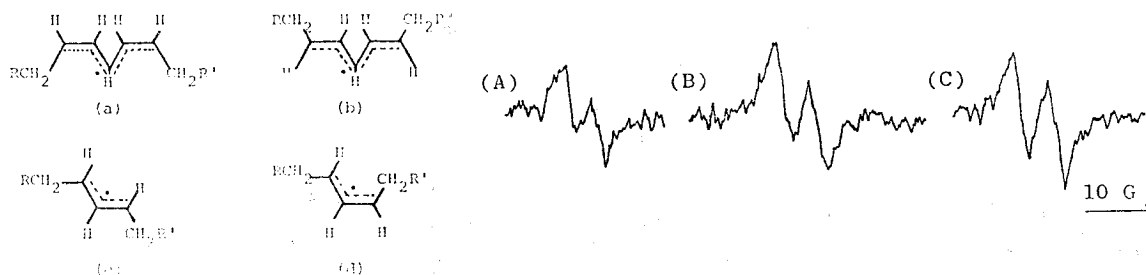


Fig. 10 Structures of Pentadienyl and Allyl Radicals from Fatty Acid Methyl Esters.

Fig. 11 ESR spectra of peroxy radicals.  
A- Methyl oleate, B- Methyl linolenate,  
C- Methyl docosahexaenoate



Fig. 12 ESR spectrum of alkyl radicals obtained on hydrogen abstraction from methyl stearate by  $\text{Bu}^t\text{O}^\cdot$  radical at  $-113^\circ\text{C}$ .

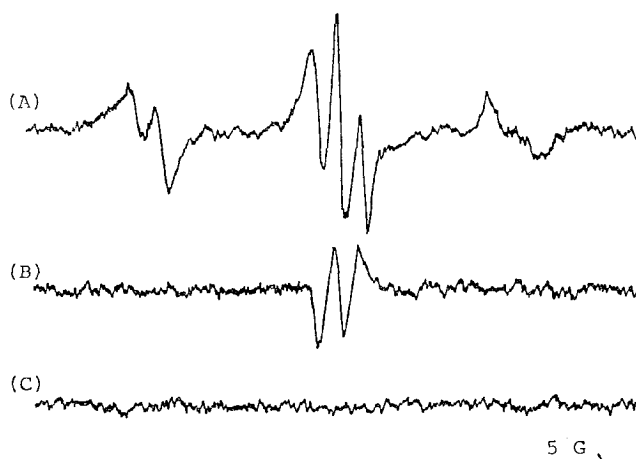


Fig. 13 ESR spectra of liver homogenate systems. Incubation systems contained 16% (w/v) liver-physiological saline plus the following additives: A, 23mM PBN and autoxidized ML; B, autoxidized ML; C, 23mM PBN.

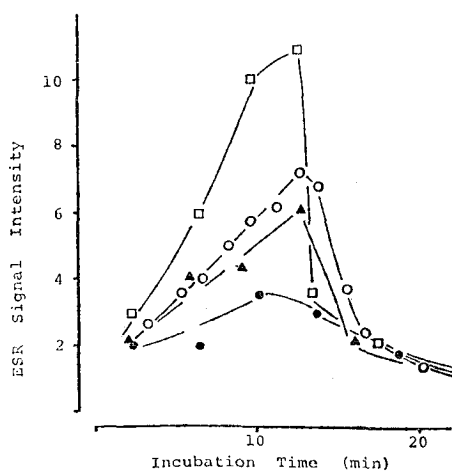


Fig. 14 Changes with time in the ESR signal intensity of spin adducts formed in liver homogenate incubated with various amounts of autoxidized ML.

The reaction system consisted of liver homogenate (16% tissue in physiological saline), 23mM PBN and various amounts of autoxidized ML in physiological saline.  
The amounts of autoxidized ML (mg/ml): ●-2.1, ▲-4.0, ○-7.8, □-11.3

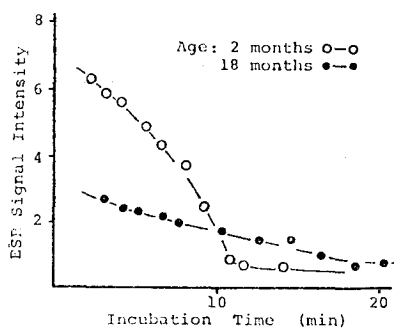


Fig. 15 The productions of the DMPO-OH adducts as a function of incubation time in liver microsomes of young (2 months) and old (18 months) rats during NADPH oxidation.

The reaction mixture consisted of 1.8 mg/ml microsomes, 6.2mM DMPO,  $2.0 \times 10^{-5}$  M  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $2.0 \times 10^{-5}$  M EDTA, 0.75mM NADPH, and 0.15M EG in 1.0M phosphate buffer, pH 7.4.

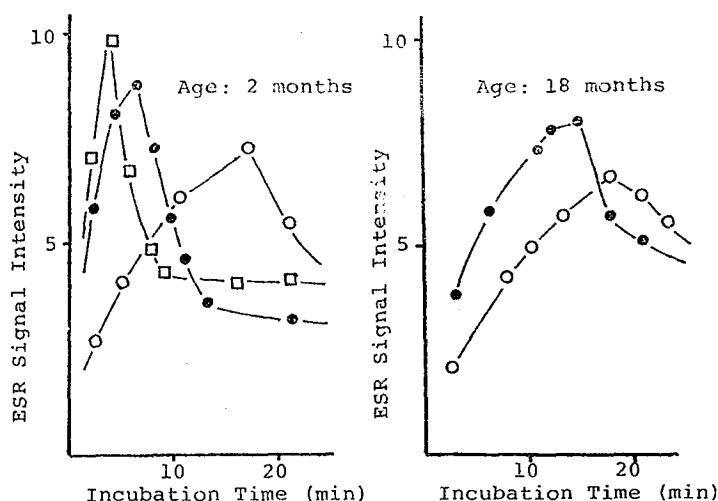


Fig. 16 Changes with time in the ESR signal intensities of PBN adducts formed in liver microsomes incubated with various amounts of ML-OOH.

The reaction mixture consisted of 0.88 mg/ml of liver microsomes, 40mM PBN, 0.15M KCl, and various amounts of ML-OOH in 1.0mM phosphate buffer, pH 7.4. The amounts of ML-OOH ( $\mu\text{mol/ml}$ ):  $\circ$  - 12,  $\bullet$  - 22,  $\square$  - 44.

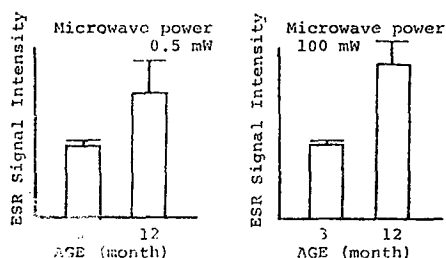
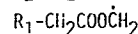
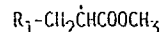


Fig. 17 Age-related change of ESR signal intensity of frozen dried rat liver.

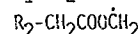
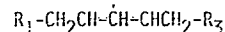
#### ALKYL RADICAL

Methyl ester

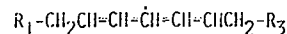
$\text{C}_{16:0}$ ,  $\text{C}_{18:0}$



$\text{C}_{18:1}$



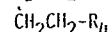
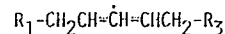
$\text{C}_{18:2}$ ,  $\text{C}_{18:3}$



$\text{C}_{22:6}$

Fatty acid

$\text{C}_{18:1}$



$\text{R}_1:\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n-$ ,  $\text{R}_2:\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_6-$

$\text{R}_3:-(\text{CH}_2)_m\text{COOCH}_3$ ,  $\text{R}_4:-(\text{CH}_2)_6\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOCH}_3$

#### PEROXY RADICAL



#### ALKOXY RADICAL



Fig. 18 Lipid radicals detected in this study.

## 審 査 結 果 の 要 旨

不飽和油脂の自動酸化反応はフリーラジカルの連鎖生成により進行するとされるが、この際のラジカル種の詳細については不明な点が多い。それはラジカルが極めて短寿命で反応性に富むため高感度の電子スピン共鳴吸収法 (ESR) によっても検出が困難で詳細な解析をなしにくいためである。

また、さいきん日本人の寿命がのびるにつれ老化現象に対する研究が盛んになった。老化には生体内に生成したペルオキシラジカルが関与するとされているが、本ラジカルを明確に捉えた報告はない。そこで本研究は ESR によるラジカル検出の際スピントラップ剤を用いてラジカルを捕捉し、ラジカルの解析を行うとともに、この方法を生体内に生成するラジカルの捕捉にも応用しようとしたものである。

本論文は5章よりなっているが、第1章ではリノール酸自動酸化物の液体窒素温度における ESR スペクトルを測定しようとしたが、検出は不可能であった。そこで、第2章においては従来油脂の分野には用いられていなかったスピントラップ法を開発し実験を行っている。すなわち、重水素置換ニトロソデュレンを用いて自動酸化リノール酸メチルの第2級アルキルラジカルの捕捉に成功している。同様の結果がリノール酸より不飽和なリノレン酸やドコサヘキサエン酸などのメチルエステルでも得られたが、パルミチン酸やステアリン酸などの飽和酸およびオレイン酸のスペクトルはリノール酸メチルとは異なり第1級アルキルラジカルの存在も推定された。本ラジカルを認めた報告は従来出されておらず、これが最初の発見である。

また、フェニル- $\alpha$ -ナフチルニトロソ (PBN) を用いペルオキシラジカルの捕捉にも成功している。

第4章においては、生体内過酸化反応により生成するラジカルを捕捉するための予備的手段としてラット肝ホモジネート、ミクロソームなどにリノール酸メチルヒドロペルオキシドを添加し、生成してくるラジカルをスピントラップ剤 (PBN) を用いて捕捉した。本ラジカルはアルコキシラジカルと推定された。また、老化ラット肝の ESR シグナル強度は幼ラットより増大していることを認めた。

本研究は従来行われていなかった油脂分野の電子スピン共鳴吸収法にスピントラップ剤を応用し多くの知見を得ることを可能にした許りでなく、生体における老化現象の解明にも役だつスピントラップ法を見出したことは油脂化学の分野のみでなく、生化学、老人医学の分野にも貢献するところが大きく農学博士の学位を与えるに十分な価値を有すると判定した。